



UNIVERSITAS SURABAYA
LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT

GEDUNG PERPUSTAKAAN Lt. 4
JALAN RAYA KALIRUNGKUT (TENGILIS), SURABAYA, 60293
TELP. (031) 2981360, 2981365 FAX. (031) 2981373

SURAT TUGAS

Nomor : 05/Lit/LPPM/MIPA/II/2011

Atas dasar proposal penelitian lanjut dari dosen Departemen MIPA & Fakultas Teknobiologi, dengan ini Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Surabaya memberi tugas kepada :

1. Restu Kartiko Widi, S.Si., M.Si., Ph.D.
2. Arief Budhyantoro, S.Si., M.Si.
3. Ruth Chrisnasari, S.TP., M.P.

Untuk melaksanakan penelitian sesuai proposal dengan judul:

Studi Imobilisasi Enzim Glukose Oksidase Pada Bentonit Termodifikasi

Dengan waktu pelaksanaan penelitian selama 12 bulan (sesuai Proposal) terhitung mulai tanggal 9 Februari 2011 sampai dengan 8 Februari 2012, dengan anggaran sebesar Rp. 29.950.000,- (Dua Puluh Sembilan Juta Sembilan Ratus Lima Puluh Ribu Rupiah), dengan rincian terlampir dan hasil akhir diwujudkan:

1. Print out laporan hasil penelitian (+ disket/CD)
2. Ringkasan hasil penelitian atau abstraksi penelitian (untuk database)
3. Menyerahkan satu buah naskah publikasi penelitian atau naskah publikasi lain untuk diterbitkan di Jurnal Ilmiah Sains dan Teknologi.

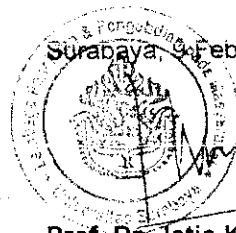
Disertai penandatanganan form persetujuan pemuatan naskah publikasi tersebut oleh peneliti.

Demikian untuk dilaksanakan sebaik-baiknya.

Mengetahui,



Prof. Ir. Lieke Riadi, Ph.D.
Wakil Rektor I



Surabaya, 9 Februari 2011

Prof. Dr. Jatie K. Pudjibudojo, SU., Psi.
Ketua

Tembusan :

1. Ketua Departemen MIPA Ubaya
2. Dekan Fakultas Teknobiologi Ubaya,
2. Direktur Keuangan Ubaya,
3. Kepala Biro Adpesdam Ubaya,
4. Yang bersangkutan.

HALAMAN PENGESAHAN

1. a. Judul Penelitian	- Studi Imobilisasi Enzim Glukose Oxidase Pada Bentonit Termodifikasi
b. Bidang Ilmu	- Sains
2. Ketua Peneliti	-
a. Nama Lengkap	- Restu Kartiko Widi, S.Si., M.Si., Ph.D
b. Jenis Kelamin	- Laki-laki
c. Gol. pangkat NPK	- III d/Lektor/199024
d. Jab. fungsional	- Dosen
e. Jab. struktural	-
f. Fakultas/Jurusan	- Dep. MIPA
g. Telp/Faks	- 031-2981398
h. email	- restu@ubaya.ac.id
3. Jumlah anggota peneliti	- 2 orang
a. Nama Anggota Peneliti	- Arief Budhyantoro, S.Si., M.Si., Ruth Chrisnasari, S.TP., M.P
4. Lokasi Penelitian	- Lab. Kimia Universitas Surabaya
5. Kerjasama dengan Institusi lain	-
6. Lama Penelitian	- 12 bulan
7. Waktu Penelitian	- Pebruari 2011 s.d. Pebruari 2012
8. Biaya yang diperlukan	- Rp. 29.950.000.-
9. Sumber Dana	-
a. Sumber dari Depdiknas	-
b. Sumber dari Univ. Surabaya	- Rp. 29.950.000.-
c. Sumber lain	-
Jumlah	- Rp. 29.950.000.-

Surabaya, Pebruari 2012

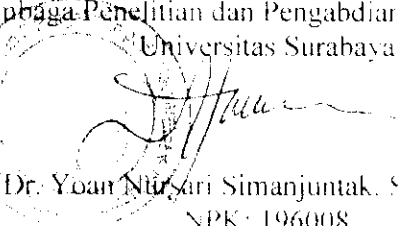
Mengetahui,
Ketua Departemen MIPA

Ketua Peneliti.

(Joice Ruth Juliana, S.Si., M.Si.)
NPK: 198033

(Restu Kartiko Widi, S.Si., M.Si., Ph.D)
NPK: 199024

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat
Universitas Surabaya


Dr. Yoan Nursari Simanjuntak, SH, MHum
NPK: 196008

HALAMAN PENGESAHAN

1. a. Judul Penelitian : Studi Imobilisasi Enzim Glukose Oksidase Pada Bentonit Termodifikasi
- b. Bidang Ilmu : Sains
2. Ketua Peneliti
a. Nama Lengkap : Restu Kartiko Widi, S.Si., M.Si., Ph.D
b. Jenis Kelamin : Laki-laki
c. Gol/pangkat/NPK : III d/Lektor/199024
d. Jab. fungsional : Dosen
e. Jab. struktural : -
f. Fakultas/jurusan : Dep. MIPA
g. Telp/Faks : 031-2981398
h. email : restu@ubaya.ac.id
3. Jumlah anggota peneliti : 2 orang
a. Nama Anggota Peneliti : Arief Budhyantoro, S.Si., M.Si.
Ruth Chrisnasari, S.TP., M.P
4. Lokasi Penelitian : Lab. Kimia Universitas Surabaya
5. Kerjasama dengan Institusi lain : -
6. Lama Penelitian : 12 bulan
7. Waktu Penelitian : Pebruari 2011 s.d. Pebruari 2012
8. Biaya yang diperlukan : Rp. 29.950.000,-
9. Sumber Dana
a. Sumber dari Depdiknas : -
b. Sumber dari Univ. Surabaya : Rp. 29.950.000,-
c. Sumber lain : -
Jumlah : Rp. 29.950.000,-

Surabaya, Pebruari 2012



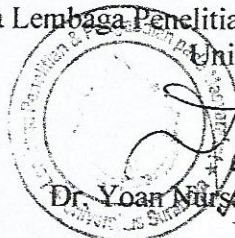
Mengetahui,
Ketua Departemen MIPA

(Joice Ruth Juliana, S.Si., M.Si)
NPK: 198033

Ketua Peneliti,

(Restu Kartiko Widi, S.Si., M.Si., Ph.D)
NPK: 199024

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat
Universitas Surabaya



Dr. Yoan Nursari Simanjuntak, SH, MHum
NPK: 196008

telah didokumentasikan
di Perpustakaan UBAYA



Elisca Tangan, M.Eng, Ph.D

LP TEK 74



**LAPORAN
PENELITIAN LANJUT**

**STUDI IMOBILISASI ENZIM GLUKOSE OXIDASE PADA
BENTONIT TERMODIFIKASI**

Oleh:

**Restu Kartiko Widi, S.Si., M.Si., Ph.D
Arief Budhyantoro, S.Si., M.Si.
Ruth Chrisnasari S.TP., M.P**

**Departemen MIPA
Universitas Surabaya**

Pebruari 2012

HALAMAN PENGESAHAN

1. a. Judul Penelitian : Studi Imobilisasi Enzim Glukose Oxidase Pada Bentonit Termodifikasi
b. Bidang Ilmu : Sains
2. Ketua Peneliti
a. Nama Lengkap : Restu Kartiko Widi, S.Si., M.Si., Ph.D
b. Jenis Kelamin : Laki-laki
c. Gol/pangkat/NPK : IIIId/Lektor/199024
d. Jab. fungsional : Dosen
e. Jab. struktural : -
f. Fakultas/jurusan : Dep. MIPA
g. Telp/Faks : 031-2981398
h. email : restu@ubaya.ac.id
3. Jumlah anggota peneliti : 2 orang
a. Nama Anggota Peneliti : Arief Budhyantoro, S.Si., M.Si.
Ruth Chrisnasari, S.TP., M.P
4. Lokasi Penelitian : Lab. Kimia Universitas Surabaya
5. Kerjasama dengan Institusi lain : -
6. Lama Penelitian : 12 bulan
7. Waktu Penelitian : Pebruari 2011 s.d. Pebruari 2012
8. Biaya yang diperlukan : Rp. 29.950.000,-
9. Sumber Dana
a. Sumber dari Depdiknas : -
b. Sumber dari Univ. Surabaya : Rp. 29.950.000,-
c. Sumber lain : -
Jumlah : Rp. 29.950.000,-

Surabaya, Pebruari 2012

Mengetahui,
Ketua Departemen MIPA

Ketua Peneliti,

(Joice Ruth Juliana, S.Si., M.Si)
NPK: 198033

(Restu Kartiko Widi, S.Si., M.Si., Ph.D)
NPK: 199024

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat
Universitas Surabaya

Dr. Yoan Nursari Simanjuntak, SH, MHum
NPK: 196008

A. JUDUL PENELITIAN

Studi Imobilisasi Enzim Glukose Oxidase Pada Bentonit Termodifikasi

B. BIDANG ILMU:

Sains

C. PENDAHULUAN

1. Latar Belakang

Enzim adalah suatu katalis biologis, yaitu suatu senyawa protein yang dapat mengkatalisis reaksi biologis dalam tubuh manusia, hewan maupun tumbuhan. Kebanyakan enzim diberi nama menurut reaksi yang dikatalisisnya, dan seringkali diberi akhiran *-ase*. Enzim memiliki berat molekul mulai dari 12.000 – 120.000 bahkan ada yang lebih tinggi. Enzim kebanyakan bekerja dalam tubuh makhluk hidup pada suhu normal tubuh dan dalam media berair.

Pada beberapa dekade yang lalu ide untuk melakukan reaksi enzimatik pada media *non-aqueous* sepertinya merupakan ide yang hampir mustahil untuk mewujudkannya. Namun dalam kurun waktu beberapa tahun terakhir pendekatan pemanfaatan enzim untuk mengkatalisis berbagai proses kimia dalam media organik telah banyak dilakukan. Masalah yang paling sering muncul pada aplikasi reaksi enzimatik seperti ini adalah adanya pengaruh media organik terhadap aktifitas enzim. Interaksi secara langsung antara enzim dengan media organik mempengaruhi konformasi aktifitas enzim sehingga dapat menurunkan aktifitasnya. Imobilisasi enzim merupakan salah satu metode yang paling menjanjikan untuk mencegah penurunan aktifitas enzim dalam pelarut organik (Elena *et al.*, 2005).

Imobilisasi enzim didefinisikan sebagai enzim-enzim yang secara fisik berada dalam suatu tempat/lokasi tertentu sehingga tidak bebas bergerak, namun tidak kehilangan aktifitas katalisisnya, dan dapat digunakan secara berulang (Chibata, 1978). Dengan karakteristiknya yang masih seperti enzim asalnya memberikan keunggulan tersendiri terhadap proses imobilisasi tersebut, yaitu enzim dapat digunakan dalam proses katalisis secara berulang dan berkesinambungan.

Salah satu enzim yang sering menjadi perhatian adalah enzim *glucose oxidase* (GOD) berkenaan dengan pemanfaatannya yang besar dalam reagen pendiagnosa penyakit, biosensor, zat aditif makanan dan sebagainya (Iwuoha and Smyth, 1994; Larreta-Garde *et al.*, 1987; Raba and Motolla, 1995). Beberapa tahun belakangan ini uji yang melibatkan imobilisasi enzim GOD telah banyak dilakukan. Salah satu yang menjadi perhatian utama dalam uji tersebut adalah stabilitas enzim dalam pelarut organik dan pada suhu tinggi (Mozhaev *et al.*, 1989). Pemanfaatan imobilisasi enzim memberikan peluang untuk meningkatkan stabilitas enzim pada konsentrasi pelarut organik yang tinggi. Imobilisasi mencegah interaksi protein-protein yang dapat menyebabkan terjadinya agregasi molekul protein sehingga pada akhirnya menyebabkan timbulnya deaktivasi enzim (Vasileva and Godjevargova, 2005).

Terdapat beberapa teknik imobilisasi enzim mulai dari pembentukan ikatan kovalen hingga pemerangkapan molekul enzim secara fisik dalam suatu material (Trevan, 1980). Material yang digunakan sebagai bahan pemerangkap enzim (*enzym support*) dapat memberikan pengaruh yang besar terhadap stabilitas enzim dan efektifitas imobilisasi enzim. Karakteristik yang paling penting bagi material yang dipergunakan sebagai *support* adalah tidak larut dalam air, memiliki kapasitas yang besar dalam mengikat enzim, stabil dan tidak mudah bereaksi (*chemically inert*). Kapasitas pengikatan enzim ini ditentukan oleh ketersediaan area permukaan baik secara internal (ukuran pori) maupun eksternal (ukuran partikel), dan kemudahan proses aktivasi (Worsfold, 1995).

Salah satu material yang dapat digunakan sebagai bahan pemerangkap enzim adalah polimer anorganik seperti lempung (*clay*). Sanjay dan Sugunan (2005) melakukan imobilisasi enzim invertase menggunakan montmorillonite K-10 melalui dua metode yaitu metode adsorpsi dan metode ikatan kovalen dan menunjukkan bahwa efisiensi imobilisasi enzim tersebut masih di bawah 40%. Sedangkan penggunaan penyangga polimer (*polymer support*) untuk imobilisasi enzim tersebut juga telah dilaporkan oleh Isik *et al* (2003) dan Cirpan *et al* (2003).

Material sejenis yang memiliki potensi untuk digunakan sebagai bahan imobilisasi enzim adalah bentonit mengingat bahwa bentonit memiliki karakteristik yang sesuai dengan material imobilisator dan terdapat melimpah di Indonesia. Bentonit adalah salah satu jenis lempung (*clay*) yang merupakan polimer silika-alumina yang tersusun atas struktur lapisan-lapisan. Indonesia merupakan salah satu sumber dan sekaligus konsumen bentonit yang cukup besar (tabel 1). Namun sayangnya, pada umumnya masyarakat penambang tradisional menjualnya dengan harga relatif murah dan menggunakannya untuk keperluan sederhana berteknologi rendah.

Tabel 1. Produksi dan konsumsi bentonit Indonesia

	2003	2002	2001	2000	1999	1998	1997
Produksi, ton	99,665.65	270,000.00	225,000.00	231,000.00	155,500.00	117,500.00	108,500.00
Konsumsi, ton	224,718.00	n/a	196,928.23	193,031.14	128,607.54	108,251.16	107,404.40
Ekspor, ton	72,512.83	114,502.32	62,834.76	63,083.30	41,651.01	18,614.11	20,257.36
Impor, ton	35,141.48	43,882.58	35,513.78	25,004.90	14,784.89	9,448.59	19,337.67

Sumber: Biro Pusat Statistika (<http://www.tekmira.esdm.go.id>)

Penggunaan bentonit untuk keperluan yang sederhana dan berteknologi rendah merupakan permasalahan yang cukup disayangkan, mengingat Indonesia merupakan penghasil bentonit yang cukup besar. Berdasarkan kenyataan bahwa bentonit menyimpan potensi besar untuk dimanfaatkan secara lebih maju, maka diperlukan suatu usaha untuk meningkatkan nilai tambahnya.

Berdasarkan hal tersebut usulan penelitian ini dimaksudkan untuk mengkaji metode interkalasi bentonite (dari serbuk bentonite alam) sebagai material imobilisasi enzim GOD guna memberikan nilai tambah terhadap hasil tambang bentonit alam Indonesia.

Material bentonit dipreparasi melalui proses pengasaman dan interkalasi menggunakan kation organik (*surfactant*). Proses ini bertujuan untuk merubah sifat dasar bentonit alam, seperti luas permukaan dan distribusi ukuran pori kearah ukuran meso. Dengan meningkatkan performanya diharapkan sifat dan kualitas material yang dihasilkan jauh lebih baik daripada bentonit alam langsung tanpa proses preparasi awal sebagai material untuk memerangkap enzim GOD. Material imobilisasi enzim yang telah dibuat akan dikarakterisasi menggunakan FT-IR dan Difraksi sinar-X (XRD). Uji aktifitas enzim GOD yang telah terimobilisasi juga akan dilakukan.

2. Perumusan Masalah

Penelitian ini dimaksudkan untuk meningkatkan nilai tambah bentonit alam sebagai material dalam proses imobilisasi enzim. Kajian yang dilakukan terhadap bentonit pada umumnya ditekankan terhadap dua hal, yaitu bagaimana mendapatkan ukuran pori bentonit yang berukuran meso (20-60 Å) atau lebih dan menjaga kestabilannya, serta mengoptimalkan sifat asam permukaannya. Ruang lingkup penelitian ini adalah bidang rekayasa material lempung melalui proses interkalasi dan pengasaman untuk dipergunakan sebagai material imobilisasi enzim GOD. Proses modifikasi bentonit melalui interkalasi dimaksudkan untuk meningkatkan ukuran pori bentonit mengingat bahwa penjerapan enzim GOD dalam proses imobilisasi enzim mengambil tempat di permukaan bentonit (baik permukaan luar maupun permukaan di dalam pori), sehingga ukuran pori diupayakan agar dapat dimasuki oleh molekul enzim GOD. Pada penelitian ini bahan penginterkalasi dibatasi pada surfaktan Trimethylammonium Hidroksida (TMA-OH), dan enzim yang digunakan dibatasi pada enzim Glucose Oxidase (GOD).

Pendekatan yang digunakan sebagai kerangka penyusunan konseptual dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

(i) Proses interkalasi yang dimaksudkan untuk meningkatkan jarak antar lapisan lempung menjadi lebih besar (membentuk pori berukuran meso 20-60 Å) dengan molekul organik (kationik, anionik dan non ionik molekul), didasarkan pada penelitian yang telah dilakukan oleh Cool *and* Vansant, 1998; Polverejan, 2000; Moreno *et. al.*, 1999; Hutson *et. al.*, 1999; Khaorapapong *et.al.*, 2002; He *et. al.*, 2004; Davis *et.al.*, 2004; Slade *and* Gates, 2004; Arief, dkk, 2007; Restu dan Arief, 2007.

(ii) Penggunaan bentonit terinterkalasi sebagai material imobilisasi enzim ini didasarkan pada konsep teoritis yang menyatakan bahwa bentonit terinterkalasi akan mempunyai ukuran pori meso 20-60Å yang diharapkan mampu dimasuki oleh molekul enzim GOD sehingga enzim GOD akan terjerap dan tidak bebas bergerak tanpa kehilangan aktifitasnya.

Berdasarkan uraian di atas, maka perumusan masalah yang diusulkan adalah sebagai berikut:

1. apakah proses pengasaman dan interkalasi bentonit menggunakan TMA-OH dapat menjadi material imobilisasi enzim GOD?
2. apakah enzim GOD yang telah terimobilisasi pada bentonit terasamkan dan terinterkalasi tahan terhadap proses pembilasan?

3. Tujuan Penelitian

Secara umum usulan penelitian ini bertujuan untuk: (i) Mempelajari metode immobilisasi enzim GOD kedalam struktur bentonit alam sebagai padatan pengemban (solid support). (ii) Mengkarakterisasi dan menganalisa struktur biomaterial bentonit alam-GOD. (iii) Melakukan uji aktivitas katalisis enzim GOD yang terimmobilisasi bentonit alam dalam reaksi oksidasi glukosa.

4. Manfaat Penelitian

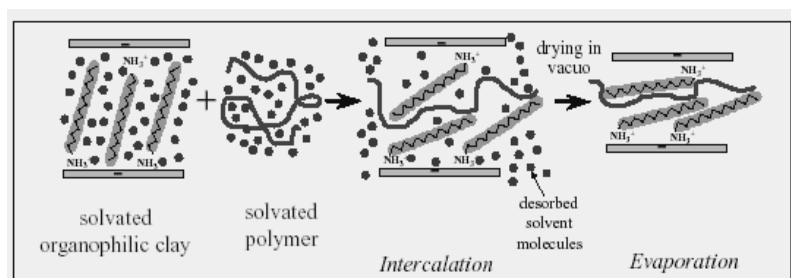
Usulan penelitian ini diyakini sangat penting dan memberikan manfaat yang besar karena menggunakan bahan dasar dari bahan alam yang ada di Indonesia sehingga mampu memberikan nilai tambah terhadap bahan alam yang melimpah di Indonesia. Secara keseluruhan manfaat yang dapat disumbangkan melalui penelitian ini adalah: (i) diperolehnya teknologi sintesis material berbahan dasar alam yang melimpah; (ii) mendorong peningkatan ilmu pengetahuan dan teknologi terutama di bidang nanomaterial di Indonesia; (iii) diharapkan hasil penelitian ini segera dapat diterapkan untuk proses imobilisasi enzim dan aplikasi untuk bidang kesehatan. Lebih khusus penelitian ini juga diharapkan mampu menghidupkan suasana ilmiah di dunia pendidikan di Universitas Surabaya pada khususnya dan tingkat nasional pada umumnya, sehingga Ubaya dapat berperan serta dalam pengembangan bidang nanoteknologi dan biologi di Indonesia.

D. Tinjauan Pustaka

Lapisan-lapisan bentonit tersusun atas tetrahedral silikat (SiO_4) pada bagian luar dan octahedral AlO_6 pada bagian dalamnya. Adanya struktur polimer silika-alumina tersebut, lempung (*clay*) memiliki muatan permukaan negatif (dan mempunyai sifat keasaman yang cukup tinggi) sehingga memiliki kemampuan untuk mengikat kation dan molekul air. Selain itu lempung juga mampu mengikat molekul organik melalui proses *entrapment* dan interaksi van der Waals biasa. Namun demikian adanya struktur lapisan pada lempung mengakibatkan lempung memiliki sifat *swelling* yaitu kemampuan untuk mengembang dan mengempis berdasarkan ukuran molekul yang masuk kedalam struktur antar lapisannya. Sifat ini terutama tampak dengan keberadaan molekul air pada struktur lapisan tersebut yang mudah diserap dan dilepas pada saat proses kalsinasi akan sangat berpengaruh terhadap *swelling* struktur antar lapisan tersebut. (Pinnavaia, 1983; Vaughan, 1988; Hutson, 1998; Cool and Vansant, 1998; Clearfield, 1998; Sarikaya *et al.*, 2000). Hal ini mengakibatkan lempung memiliki kapasitas adsorpsi yang relatif rendah.

Untuk meningkatkan kemampuan mengikat molekul organik pada lempung guna meningkatkan nilai tambahnya, beberapa peneliti telah melakukan beberapa usaha antara lain menginterkalasi lempung dengan molekul organik (kationik, anionik dan non ionik molekul). Proses ini mengakibatkan jarak antar lapisan lempung menjadi lebih besar, sehingga lempung cenderung membentuk pori berukuran meso (20-60 Å). Akibatnya lempung memiliki sifat selektifitas yang baik terhadap molekul berukuran besar, terutama molekul organik. (Cool and Vansant; Polverejan, 2000; Moreno *et al.*, 1999; Hutson *et al.*, 1999; Khaorapapong *et al.*, 2002; He

et.al., 2004; Davis *et.al.*, 2004; Slade and Gates, 2004). Proses interkalasi molekul dan polimer organik pada lempung diberikan pada gambar 1.



Gambar 1. Proses masuknya polimer organik kedalam struktur antar lapisan lempung pada proses pembuatan clay-nanocomposite.

Beberapa peneliti memanfaatkan lempung hasil interkalasi sebagai katalis, seperti dalam reaksi asilasi amina (B. M. Choudary *et.al.*, 2001), sintesis tocopherols (US Patent 5610113), beberapa reaksi polimerisasi (US Patent 6495511), kondensasi langsung asam karboksilat dengan alkohol (M. L. Kantam *et.al.*, 2001), silasi benzena (Vasant R.C.*et.al.*, 2001). Selain itu juga telah ada peneliti yang memanfaatkan jenis lempung montmorillonite K-10 sebagai bahan pemerangkap enzim invertase (Sanjay dan Sugunan, 2005).

Salah satu jenis enzim yang banyak mendapat perhatian adalah enzim *glucose oxidase* (GOD). GOD adalah enzim yang banyak dimanfaatkan dalam biosensor glukosa. Enzim GOD umumnya diisolasi dari *Penicillium* dan *Aspergillus* dengan kurva aktivitas berkisar pada pH 4,5-7,5 dan suhu 30-60 °C. Peningkatan suhu sampai 70 °C akan menurunkan aktivitasnya dan tidak ada aktivitas pada suhu 80 °C (Whittaker *et al.*, 2003). Denaturasi termal GOD seringkali disebabkan oleh ketidakstabilan interaksi ionik-hidrofobik dan putusannya ikatan hidrogen, gaya Van der Waals dan interaksi ionik yang selanjutnya mengakibatkan perubahan konformasi struktur tersier enzim sehingga mengakibatkan berkurangnya atau bahkan menghilangnya aktifitas enzim GOD (Sarath *et al.*, 2004; Tsuge *et al.*, 1975). Oleh karena itu, bagaimana enzim GOD terikat dengan bahan pengimobilisasinya sangat berperan dalam proses imobilisasi dan aktifitasnya.

Penelitian ini mengoptimalkan sifat dasar bentonit yaitu keasaman permukaannya dan meningkatkan ukuran pori bentonit sampai di ukuran meso (20 – 60 Å), untuk digunakan sebagai bahan pengimobilisasi enzim dengan menjebak molekul enzim dalam pori bentonit, sehingga diharapkan molekul enzim (dalam hal ini adalah enzim GOD) tidak mudah terlepas atau berkurang selama proses katalitiknya, namun tidak menyebabkan molekul enzim kehilangan aktifitasnya. Perbedaan mendasar dari penelitian yang diusulkan dengan penelitian terdahulu baik yang telah dilakukan oleh pengusul maupun peneliti lain adalah terletak pada proses interkalasi lempung, surfaktan yang digunakan, sumber bentonit, serta pemanfaatannya sebagai bahan imobilisasi enzim GOD. Pemanfaatan jenis lempung sebagai bahan pemerangkap enzim pernah dilakukan oleh Sanjay dan Sugunan (2005), namun jenis lempung yang digunakan adalah montmorillonite K-10 sintetis tanpa proses interkalasi serta enzim yang digunakan adalah enzim invertase.

Beberapa penelitian pendahuluan yang telah dikerjakan oleh tim peneliti untuk menunjang penelitian ini secara langsung adalah: Pillarisasi bentonit alam menggunakan logam Al dan Fe dan aplikasinya sebagai katalis (Arief dkk, 2004); Modifikasi zeolit alam menggunakan surfaktan HDTMA dan aplikasinya dalam proses adsorpsi fenol dalam sistem larutan (Arief dkk. 2004); Pillarisasi dan karakterisasi struktur bentonit alam-surfaktan terpillar logam Al, Fe dan campuran logam Al-Fe (2005), serta pemanfaatannya sebagai katalis hidroksilasi fenol (2006), sebagai adsorben ion Cr (Arief, dkk, 2007), sebagai adsorben ion Cu (Restu dan Arief, 2007), dan sebagai katalis reaksi esterifikasi asam lemak (Restu dan Arief, 2009).

E. METODE PENELITIAN

Penelitian ini akan dibagi menjadi dua tahapan. Tahap pertama adalah modifikasi bentonit alam. Pada bagian ini dilakukan proses interkalasi bentonit alam dengan kation molekul surfaktan TMA-OH (Tri Methyl Ammonium Hidroksida), dan proses pengasaman bentonit. Hasil interkalasi dan pengasaman bentonit digunakan sebagai bahan pengimobilisasi enzim GOD yang selanjutnya diuji aktifitasnya. Hasil reaksi dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Semua tahapan penelitian baik proses imobilisasi enzim maupun uji aktifitasnya dilakukan di laboratorium kimia dan laboratorium teknobiologi Universitas Surabaya.

Imobilisasi enzim dalam penelitian ini diawali dengan proses interkalasi bentonit alam asal Kab. Pacitan, Jawa Timur.

1. *Interkalasi kation organik pada bentonit alam*

Dalam proses ini interkalasi dilakukan dengan mencampur larutan surfaktan dan suspensi bentonit, dimana rasio bentonit : Vol. larutan surfaktan = 1gr : 50 ml, sedangkan variasi konsentrasi surfaktan yang digunakan adalah antara 0,75% sampai 5% (b/V). Pada kajian ini digunakan surfaktan Trimethylammonium Hidroksida (TMA-OH). Campuran diaduk selama 5 jam, kemudian dicuci, disaring dan dikeringkan. Hasil interkalasi ini selanjutnya disebut sebagai suspensi bentonit-organik yang akan digunakan pada proses pillarisasi tidak langsung.

2. *Pengasaman bentonit alam*

Pengasaman dilakukan menggunakan larutan HCl 2 M, dengan rasio bentonit : larutan HCl adalah 1 gr : 20 ml. Setelah campuran terbentuk maka campuran tersebut dibiarkan selama 24 jam disertai pengadukan pada suhu kamar. Campuran kemudian dicuci hingga pH air cucian netral, padatan bentonit disaring dan dikeringkan menggunakan oven pada suhu 100 °C.

3. *Imobilisasi enzim GOD menggunakan bentonit termodifikasi*

Proses imobilisasi enzim GOD dilakukan dengan mencampurkan bentonit termodifikasi dalam jumlah setara dengan bufer pospat 0,1 M dan larutan enzim GOD. Campuran diaduk menggunakan *water bath shaker* selama 1 jam, dan selanjutnya dilakukan pemisahan menggunakan *centrifuge* pada 1°C selama 1 jam. Protein enzim dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Kemudian menghitung jumlah enzim yang *leaching* (lepas dari matriks) yang dilakukan dengan membilas larutan enzim terimobilisasi menggunakan demineralised water, kemudian dianalisis kadar protein dalam cairan hasil bilasan menggunakan metode Bradford

4. Uji aktifitas enzim GOD terimobilisasi

Uji aktifitas enzim GOD terimobilisasi dilakukan dengan mencampur 1ml larutan glukosa (2 gr/L pada 0,2 bufer Tris fosfat pH 7), 0,1 mL larutan *o*-Dianisidin (2 g/L pada 0,2 bufer Tris fosfat pH 7), 0,1 ml horseradish peroksidase (60 unit/ml pada bufer Tris fosfat pH 7), 0,8 ml gliserol, dan 10-20 μ l enzim GOD terimobilisasi (10 IU/ml). Campuran kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu 30 °C. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 2 ml HCl 5M. *o*-Dianisidin teroksidasi diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada 525 nm (Whittington *et al*, 1990 dalam Whittaker *et al.*, 2003).

5. Uji kestabilan enzim GOD terimobilisasi

Uji kestabilan enzim GOD terimobilisasi dilakukan dengan pengujian aktivitas enzim GOD terimobilisasi pada beberapa kali ulangan reaksi serta dilakukan perhitungan nilai K_m dan V_{max} .

F. HASIL DAN PEMBAHASAN

F.1 Imobilisasi Enzim GOD Pada Bentonit Termodifikasi HCl

Bentonit sebesar 140 mesh dimodifikasi menggunakan HCl dengan berbagai konsentrasi yaitu: 1 M, 1,5 M, 2 M, 2,5 M dan 3 M. Bentonit yang telah termodifikasi digunakan untuk imobilisasi enzim GOD. Sebelum dilakukan imobilisasi larutan enzim yang digunakan diukur absorbansinya untuk mengetahui konsentrasi enzim awal dengan menggunakan metode Hartree Lowry. Setelah proses imobilisasi dilakukan, supernatan dari larutan imobilisasi diukur absorbansinya untuk mengetahui enzim bebas yang masih tersisa dengan menggunakan metode Hartree Lowry. Dengan demikian akan diketahui konsentrasi enzim yang terimobilisasi yaitu dengan mengurangi konsentrasi enzim awal dengan konsentrasi enzim bebas. Tabel 2 menunjukkan hasil imobilisasi dengan 3 kali pengulangan.

Tabel 2 Hasil imobilisasi bentonit termodifikasi asam HCl

Variasi konsentrasi HCl	Konsentrasi enzim						Terimobilisasi/awal (%)		
	Awal (IU/ml)			Terimobilisasi (IU/ml)					
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	10,14	10,14	10,14	1,28	2,11	2,75	12,65	20,78	27,10
1 M	17,92	17,92	10,14	14,38	17,92	10,14	80,22	100	100
1,5 M	17,92	17,92	10,14	16,48	15,66	10,14	91,97	87,37	100
2 M	17,92	17,92	10,14	17,92	17,92	10,14	100	100	100
2,5 M	17,92	16,37	10,14	10,07	11,26	8,43	56,21	68,83	83,10
3 M	17,92	16,37	10,14	12,55	11,72	6,78	70	71,62	66,84

Pada proses pengasaman, bentonit akan terlapis dengan lapisan hidrogen. Adanya lapisan hidrogen pada bentonit ini dapat dimanfaatkan untuk mengikat enzim GOD secara ikatan ionik dalam kondisi pH di atas pI enzim GOD (pI GOD = 4,2). Pada dasarnya, ikatan yang terjadi antara bentonit dengan enzim akan ditentukan oleh asam amino-asam amino yang bermuatan pada rantai samping enzim. Ikatan ionik yang terjadi antara bentonit dan enzim GOD dapat terbentuk karena enzim GOD memiliki asam amino dengan gugus rantai samping yang bermuatan negatif sehingga akan berikatan dengan H^+ pada bentonit termodifikasi. Adapun asam amino bermuatan negatif yang terkandung pada enzim GOD adalah asam glutamat dan asam aspartat.

Kandungan asam glutamat dan asam aspartat pada enzim GOD sebesar 12,37 % mol dan 10,39% mol.

Selain itu, pada penelitian ini juga dilakukan imobilisasi enzim GOD pada bentonit tanpa modifikasi. Dari hasil yang diperoleh diketahui bahwa persentase enzim GOD yang terimobilisasi sangat rendah apabila dibandingkan dengan persentase enzim GOD terimobilisasi pada bentonit termodifikasi asam. Adapun rata-rata persentase enzim terimobilisasi pada bentonit tidak termodifikasi sebesar 20,17% sedangkan pada bentonit termodifikasi asam sekitar 69,38% hingga 100%. Dari hasil yang diperoleh, dapat diketahui bahwa terjadi kenaikan persentase enzim terimobilisasi sebesar 3 hingga 5 kali lipat dari bentonit termodifikasi asam jika dibandingkan dengan bentonit tanpa modifikasi. Hal ini menunjukkan bahwa proses modifikasi menggunakan asam memiliki pengaruh yang cukup signifikan terhadap proses imobilisasi. Seiring dengan meningkatnya konsentrasi asam hingga 2 M yang digunakan tidak akan berpengaruh terhadap hasil imobilisasi. Namun, konsentrasi asam di atas 2 M menunjukkan penurunan jumlah enzim yang terimobilisasi. Hal ini dapat terjadi karena penambahan konsentrasi asam yang terlalu tinggi dapat merusak struktur bentonit itu sendiri, yaitu kerusakan struktur bentonit dengan hilangnya gugus Al-O aluminosilikat (dealuminisasi) pada lembaran oktahedral. Dengan hilangnya gugus Al-O ini, diduga menyebabkan enzim tidak dapat terikat dengan baik pada bentonit.

F.1.1 Penentuan suhu terbaik

Untuk semua uji aktifitas definisinya adalah sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas enzim (mmol/L.min)} = \frac{\text{Konsentrasi enzim terimobilisasi}}{\text{Waktu inkubasi (60 menit)}}$$

$$\text{Aktivitas spesifik (mmol/L.min.mg)} = \frac{\text{Aktivitas enzim}}{\text{Berat protein}}$$

Bentonit termodifikasi yang digunakan pada tahap selanjutnya adalah bentonit yang dimodifikasi dengan asam HCl 2 M. Pada karakterisasi suhu, enzim direaksikan dengan substrat dan kromogen o-dianisidine pada kondisi pH 7 dan diinkubasi dengan variasi suhu. Suhu inkubasi yang digunakan antara lain: 30±2°C, 40°C, 50°C dan 60°C. Hasil inkubasi kemudian diukur pada panjang gelombang 525 nm. Pengujian ini dilakukan sebanyak 3 kali replikasi. Konsentrasi enzim yang digunakan adalah 17,922 IU/ml. Tabel 3 menunjukkan jumlah konsentrasi glukosa yang dikonsumsi oleh enzim GOD serta aktivitas dari enzim GOD terimobilisasi dan enzim GOD bebas pada berbagai variasi suhu.

Tabel 3 Pengaruh variasi suhu terhadap aktivitas enzim GOD terimobilisasi bentonit dan GOD bebas

Variasi suhu	30±2°C		40°C		50°C		60°C	
	i	b	i	b	i	b	i	b
Rata-rata konsentrasi glukosa (mmol/L)	0,246	0,454	0,240	0,428	0,206	0,351	0,101	0,219
Aktivitas (mmol/L.min)	0,004	0,008	0,004	0,007	0,003	0,006	0,002	0,004
Aktivitas Spesifik (mmol/L.min.mg)	0,059	0,145	0,057	0,136	0,049	0,112	0,024	0,070

Ket: i = GOD terimobil; b = GOD bebas

Pemilihan suhu terbaik didasarkan pada nilai aktivitas maupun aktivitas spesifik tertinggi dari variasi suhu yang diujikan. Semakin tingginya aktivitas akan diikuti dengan semakin tingginya jumlah glukosa yang dikonsumsi selama reaksi berlangsung. Hasil suhu terbaik dalam penelitian ini adalah 30 hingga 40°C. Namun, suhu ini tidak dapat dikatakan sebagai suhu optimum enzim GOD terimobilisasi karena peneliti tidak melakukan pengujian pada suhu di bawah 30°C. Apabila aktivitas enzim GOD terimobilisasi turun signifikan ketika suhu berada di bawah suhu 30°C, barulah dapat dikatakan pemilihan suhu terbaik pada penelitian ini adalah suhu optimum enzim GOD terimobilisasi. Untuk tahap selanjutnya akan digunakan suhu 30±2°C.

Selain itu, pada penelitian ini juga dilakukan karakterisasi suhu terhadap enzim GOD bebas dengan variasi suhu yang sama dengan enzim GOD terimobilisasi. Berdasarkan hasil, diperoleh jumlah glukosa yang dikonsumsi pada suhu inkubasi 30±2°C dan 40°C tidak berbeda signifikan. Hal ini menunjukkan adanya kesamaan suhu inkubasi antara GOD terimobilisasi dan enzim GOD bebas. Dengan demikian, dapat dikatakan bahwa proses imobilisasi yang dilakukan tidak mempengaruhi suhu terbaik bagi enzim GOD untuk bekerja mengubah substrat glukosa menjadi produk glukonolakton.

Berdasarkan kinetika reaksi enzim, diketahui bahwa semakin tinggi suhu reaksi, maka semakin cepat pergerakan molekul enzim di dalam larutan. Hal ini menyebabkan kemungkinan kontak antara substrat dan enzim semakin besar pula. Seiring dengan semakin besar kontak antara enzim dan substrat ini menyebabkan kenaikan aktivitas dari enzim itu sendiri. Namun, terdapat suhu optimum bagi suatu enzim dimana aktivitas enzim tertinggi. Suhu di atas suhu optimum akan menyebabkan penurunan aktivitas enzim akibat kerusakan struktur enzim (Ekananda, 2007). Pada enzim terimobilisasi, kenaikan suhu belum tentu meningkatkan pergerakan dari molekul enzim. Hal ini disebabkan enzim tertahan pada matriks pengimobilisasi. Adanya pergerakan yang terbatas dari enzim GOD terimobilisasi inilah yang menyebabkan aktivitasnya lebih kecil dari aktivitas enzim GOD bebas.

Apabila dilihat dari hasil percobaan yang diperoleh, maka terlihat adanya penurunan jumlah glukosa yang dikonsumsi enzim dari suhu 30±2°C hingga 60°C. Selain itu, dapat juga dilihat adanya penurunan nilai aktivitas enzim terimobilisasi dari suhu 30±2°C hingga 60°C. Adanya penurunan ini kemungkinan dikarenakan pada suhu di atas 30±2°C, struktur enzim menjadi terganggu akibat panas yang diberikan. Panas yang diberikan pada enzim, dapat menyebabkan terputusnya ikatan-ikatan yang terdapat pada enzim, sehingga menyebabkan struktur 3D enzim menjadi terganggu. Hal ini dapat menyebabkan perubahan pada sisi aktif enzim yang berdampak pada penurunan aktivitas enzim. Adanya penurunan aktivitas ini didukung dengan hasil karakterisasi suhu enzim bebas yang juga menunjukkan hasil yang sama dengan enzim terimobilisasi, yaitu: suhu terbaik 30±2°C dan 40°C, serta terjadi penurunan aktivitas yang signifikan ketika suhu dinaikan menjadi 50°C dan 60°C.

F.1.2 Penentuan pH terbaik

Dari hasil karakterisasi suhu kemudian dipilih suhu terbaik yang kemudian digunakan pada tahap-tahap selanjutnya. Suhu inkubasi yang digunakan pada tahap karakterisasi pH adalah 30±2°C. Karakterisasi pH dilakukan dengan mereaksikan enzim terimobilisasi dengan substrat dan kromogen o-dianisidine pada suhu 30±2°C dan variasi pH. Variasi pH yang digunakan antara lain: 4,5, 5,5, 6,5, 6,75, 7, 7,25 dan 7,5. Absorbansi dari produk yang terbentuk dari reaksi yang terjadi kemudian diukur pada

panjang gelombang 525 nm. Tabel 4 menunjukkan hasil penentuan pH terbaik yang dilakukan.

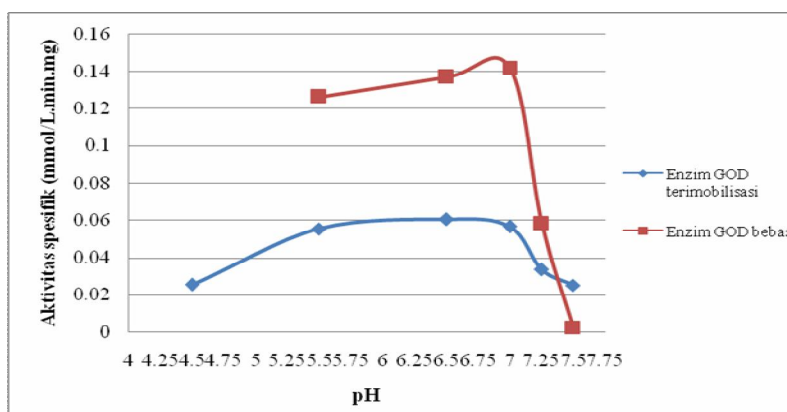
Tabel 4 Pengaruh variasi pH terhadap aktivitas enzim GOD terimobilisasi bentonit

Variasi pH	4,5	5,5	6,5	6,75	7	7,25	7,5
Rata-rata konsentrasi glukosa (mmol/L)	0,107	0,231	0,252	0,224	0,237	0,141	0,105
Aktivitas (mmol/L.min)	0,002	0,004	0,004	0,004	0,004	0,002	0,002
Aktivitas Spesifik (mmol/L.min.mg)	0,025	0,055	0,060	0,053	0,057	0,034	0,025

Tiap enzim memerlukan pH (tingkat keasaman) optimum yang berbeda-beda karena enzim adalah protein, yang dapat mengalami perubahan bentuk jika keasaman berubah. Di luar pH yang sesuai, ionisasi enzim akan terganggu sehingga berdampak pada kerusakan struktur enzim. Hal ini menyebabkan enzim tidak dapat bekerja secara optimal bahkan kehilangan fungsinya sama sekali. Oleh sebab itu, diperlukan karakterisasi pH terhadap suatu enzim untuk mengetahui keadaan pH terbaik yang dimilikinya. Pada penelitian ini, menggunakan 2 macam buffer yaitu buffer asetat yang digunakan pada pH 4,5 dan 5,5 dan buffer fosfat pada pH 6,5 hingga 7,5. Jumlah glukosa tertinggi yang dikonsumsi oleh enzim GOD terimobilisasi terletak pada pH 5,5, 6,5, 6,75, dan 7, dimana hal ini didukung dengan nilai aktivitas spesifiknya yang tinggi yaitu sebesar 0,055 mmol/L.min.mg, 0,060 mmol/L.min.mg, 0,053 mmol/L.min.mg dan 0,057 mmol/L.min.mg sehingga keempat variasi pH ini dapat dikatakan sebagai pH terbaik bagi enzim GOD terimobilisasi bentonit. Namun, pada tahap selanjutnya digunakan pH 6,5 karena letak pH 6,5 yang relatif jauh dari titik kritis. Adapun yang dimaksudkan dengan titik kritis adalah titik dimana enzim memiliki aktivitas terendah yaitu pada pH 4,5, 7,25 dan 7,5. pH 5,5 dan 7 walaupun tidak berbeda signifikan dengan pH 6,5 namun terletak bersebelahan dengan titik kritis sehingga tidak dipilih.

Selain itu, dilakukan juga karakterisasi pH untuk enzim GOD bebas. Berdasarkan pengolahan data yang dilakukan, diperoleh hasil dimana aktivitas spesifik pada pH 5,5 hingga 7 tidak berbeda signifikan dan memiliki nilai yang tinggi. Namun, pada pH 7,25 dan 7,5, aktivitas spesifik enzim menjadi kecil dan berbeda signifikan dengan pH 5,5-7 (lihat tabel 38 pada lampiran). Hal ini menunjukkan bahwa pH terbaik bagi enzim GOD bebas yang digunakan pada penelitian ini adalah pH dengan *range* 5,5 hingga 7. Apabila dibandingkan karakterisasi pH dari enzim GOD terimobilisasi dengan GOD bebas yang digunakan pada penelitian ini, maka dapat dilihat bahwa karakter pH dari kedua jenis enzim ini sama. Dengan demikian, dapat dikatakan bahwa proses imobilisasi tidak mempengaruhi pH terbaik enzim GOD untuk bekerja mengkatalis perubahan glukosa menjadi glukonolakton. Gambar 2 menunjukkan pengaruh pH terhadap aktivitas spesifik enzim GOD terimobilisasi dan bebas.

Dari data-data yang diperoleh, diketahui bahwa aktivitas spesifik enzim terimobilisasi pada pH 4,5 memiliki nilai yang kecil yaitu sebesar 0,025 mmol/L.min.mg (lihat tabel 4.4). Hal ini berarti enzim GOD terimobilisasi kurang dapat bekerja pada pH 4,5. Pada buffer pH 4,5 ini, terdapat akumulasi ion H^+ di dalam larutan reaksi. Akumulasi H^+ ini dapat memprotonasi enzim GOD. Protonasi dari ion H^+ ini menyebabkan transfer elektron pada enzim menjadi terganggu atau merusak struktur dari enzim itu sendiri. Hal ini menyebabkan enzim tidak dapat bekerja secara maksimal atau bahkan kehilangan aktivitasnya seperti yang terlihat pada hasil percobaan.



Gambar 2. Kurva pengaruh pH terhadap aktivitas spesifik enzim GOD terimobilisasi dan bebas

Aktivitas enzim GOD terimobilisasi kemudian meningkat pada pH 5,5 hingga 7, namun turun kembali pada pH 7,25 dan 7,5. pH 5,5 hingga 7 dapat dikatakan sebagai pH terbaik untuk kerja enzim GOD terimobilisasi bentonit termodifikasi asam. Penurunan aktivitas pada enzim GOD baik terimobilisasi maupun bebas pada pH 7,25 dan 7,5 terjadi karena terganggunya proses regenerasi enzim dari bentuk tereduksi menjadi teroksidasi.

Apabila dibandingkan aktivitas spesifik dari enzim terimobilisasi dengan enzim GOD bebas baik pada karakterisasi suhu maupun pH, dapat dilihat bahwa aktivitas spesifik enzim GOD bebas lebih besar dibandingkan enzim GOD terimobilisasi. Adapun beberapa alasan yang kemungkinan menjadi penyebab penurunan aktivitas enzim terimobilisasi ini, yaitu:

1. Enzim yang terimobilisasi pada bentonit memiliki kemungkinan kontak dengan substrat yang lebih kecil dibandingkan enzim bebas. Hal ini menyebabkan laju pembentukan produk menjadi lebih kecil dibandingkan enzim bebas yang memiliki pergerakan yang lebih bebas. Selain itu, imobilisasi juga membatasi kontak antara enzim dengan O_2 , dimana diketahui bahwa proses regenerasi enzim GOD membutuhkan O_2 .
2. Kemungkinan terdapat enzim GOD yang berikatan dengan bentonit melalui beberapa ikatan ionik (satu unit enzim menggunakan beberapa asam amino bermuatan negatif untuk berikatan dengan bentonit). Hal ini diduga menyebabkan transfer elektron (ionisasi) pada enzim menjadi terganggu. Adanya gangguan ionisasi enzim ini menyebabkan perubahan struktur dari enzim GOD terimobilisasi sehingga menyebabkan enzim menjadi tidak aktif. Aktivitas yang terukur merupakan aktivitas dari enzim yang berikatan dengan bentonit melalui satu atau sedikit ikatan ionik sehingga tidak berpengaruh secara signifikan terhadap transfer elektron maupun perubahan struktur enzim, sehingga enzim ini masih memiliki aktivitas dalam mengubah substrat menjadi produk.
3. Kemungkinan terdapat beberapa unit enzim yang menggunakan rantai samping dari sisi aktifnya untuk berikatan dengan bentonit mengingat sisi aktif enzim GOD juga mengandung asam glutamat yang bermuatan negatif. Hal ini menyebabkan konfigurasi sisi aktif enzim menjadi terganggu sehingga enzim tidak dapat bekerja. Adanya aktivitas yang terukur adalah aktivitas dari enzim

yang berikatan dengan bentonit melalui rantai samping dari asam amino bermuatan negatif yang bukan berasal dari sisi aktif enzim.

4. Kemungkinan adanya konfigurasi dari beberapa enzim GOD terimobilisasi yang menyebabkan terhalangnya sisi aktif enzim akibat berikatan dengan bentonit, sehingga substrat tidak dapat masuk ke sisi aktif tersebut. Adapun aktivitas yang terukur merupakan aktivitas dari enzim terimobilisasi yang memiliki sisi aktif yang dapat dijangkau oleh substrat.

F.1.3 Penentuan K_m dan V_{max}

Setelah diketahui pH dan suhu terbaik dari enzim GOD terimobilisasi bentonit termodifikasi asam HCl 2 M, kemudian dilakukan penentuan K_m dan V_{max} . Penentuan K_m dan V_{max} dilakukan dengan mereaksikan enzim terimobilisasi dengan variasi konsentrasi substrat glukosa. Pada tahapan ini, digunakan 7 variasi konsentrasi glukosa, yaitu: 1%, 2%, 3%, 6%, 9%, 12% dan 15%. Masing-masing variasi glukosa dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Hasil konsentrasi glukosa yang diperoleh kemudian dirata-rata dan digunakan dalam penentuan K_m dan V_{max} . Penentuan K_m dan V_{max} dilakukan dengan menggunakan persamaan Lineweaver-Burk. Berdasarkan persamaan ini, maka akan diperoleh data seperti yang ditunjukkan pada tabel 5.

Tabel 5 Penentuan K_m dan V_{max} enzim GOD terimobilisasi bentonit

Glukosa (%)	Konsentrasi H_2O_2 (mg/L)	[S](mg/L)	1/[S]	V (mg/L.min)		1/V	
				i	b	i	b
1	4,026	5000	$2,0 \times 10^{-4}$	0,067	0,12	14,905	8,20
2	5,874	10000	$1,0 \times 10^{-4}$	0,098	0,16	10,215	6,12
3	7,360	15000	$6,7 \times 10^{-5}$	0,123	0,18	8,152	5,49
6	8,284	30000	$3,3 \times 10^{-5}$	0,138	0,21	7,243	4,81
9	9,208	45000	$2,2 \times 10^{-5}$	0,153	0,22	6,516	4,51
12	9,690	60000	$1,7 \times 10^{-5}$	0,162	0,24	6,192	4,25
15	9,730	75000	$1,3 \times 10^{-5}$	0,162	0,25	6,166	3,97

Ket: i = GOD terimobil; b = GOD bebas

Dari data di atas, maka diperoleh persamaan sebagai berikut:

Untuk enzim terimobil, $y = 46936x + 5,4519$ sehingga didapatkan nilai V_{max} sebesar 0,1834 mg/L.min dan nilai K_m 8609,1087 mg/L, sedangkan untuk enzim bebas $y = 21568x + 3,9417$ sehingga didapatkan nilai V_{max} sebesar 0,2537 mg/L.min dan K_m sebesar 5471,7507 mg/L.

V_{max} merupakan kecepatan maksimum enzim dalam mengubah substrat menjadi produk, sedangkan K_m adalah konsentrasi substrat yang diperlukan oleh suatu enzim untuk mencapai setengah kecepatan maksimumnya (Wiseman, 1989). Berdasarkan kinetika reaksi enzim, apabila jumlah substrat, dalam hal ini adalah glukosa, yang digunakan dalam reaksi semakin banyak, maka semakin besar aktivitas dari enzim yang mengkatalis reaksi tersebut, begitupun sebaliknya. Hal ini terlihat dari hasil percobaan, dimana dengan semakin meningkatnya konsentrasi glukosa, maka semakin meningkat juga aktivitas dari enzim GOD terimobilisasi.

Apabila dibandingkan nilai K_m dan V_{max} dari enzim GOD bebas dan terimobilisasi, maka dapat dilihat adanya penurunan nilai V_{max} dan kenaikan nilai K_m . Hal ini menunjukkan bahwa proses imobilisasi menggunakan bentonit termodifikasi

asam mempengaruhi kecepatan reaksi dari enzim GOD. Hal ini didukung dengan aktivitas dari enzim GOD bebas yang ± 10 kali lebih besar dibandingkan enzim GOD terimobilisasi. Adapun alasan adanya perbedaan aktivitas ini seperti yang telah disebutkan sebelumnya pada penjelasan karakterisasi suhu dan pH. Dengan adanya penurunan aktivitas dari enzim GOD terimobilisasi ini menyebabkan laju pemecahan substrat menjadi produk pun menjadi kecil, dimana hal ini menyebabkan jumlah glukosa yang diubah saat mencapai setengah kecepatan maksimum pun menjadi lebih besar apabila dibandingkan dengan enzim bebas.

F.1.4 Penentuan Cycle Pemakaian Maksimum Enzim Terimobilisasi bentonit-asam

Penentuan ini dilakukan dengan cara mereaksikan enzim terimobilisasi yang sama dengan substrat dan kromogen o-dianisidine sebanyak n kali hingga aktivitas enzim menunjukkan penurunan yang signifikan apabila dibandingkan dengan aktivitas enzim terimobilisasi awal. Tabel 6 menunjukkan aktivitas dari enzim terimobilisasi yang digunakan sebanyak 7 kali *cycle*.

Tabel 6 Penentuan *cycle* pemakaian maksimum dari enzim GOD terimobilisasi bentonit-asam

<i>Cycle</i>	Konsentrasi glukosa (mmol/L)	Aktivitas (mmol/L.min)	Aktivitas Spesifik (mmol/L.min.mg)	% Penurunan aktivitas spesifik
1	0,179	$3,0 \times 10^{-3}$	0,043	0
2	0,164	$2,7 \times 10^{-3}$	0,039	9,302
3	0,161	$2,7 \times 10^{-3}$	0,038	11,628
4	0,151	$2,5 \times 10^{-3}$	0,036	16,279
5	0,148	$2,5 \times 10^{-3}$	0,035	18,605
6	0,144	$2,4 \times 10^{-3}$	0,035	18,605
7	0,124	$2,1 \times 10^{-3}$	0,030	30,232

Dari data yang diperoleh, diketahui bahwa terjadi penurunan konsentrasi glukosa yang digunakan dalam reaksi dari pemakaian enzim terimobilisasi pertama hingga pengulangan ke 7. Selain itu, aktivitas yang dihasilkan pun turun dengan semakin bertambahnya jumlah pemakaian. Hal ini disebabkan adanya enzim GOD yang *leaching* pada setiap *cycle*. Namun, pada penelitian ini tidak dilakukan uji *leaching* mengingat belum diketahuinya metode yang sesuai untuk menganalisisnya. Sedangkan apabila dilihat dari % penurunan aktivitas spesifik enzim GOD yang terjadi, diketahui bahwa hingga pemakaian ke 7, penurunan aktivitas spesifik belum mencapai 50% dan penurunan yang terjadi pun tidak terlalu signifikan diantara *cycle*. Secara umum dapat disimpulkan bahwa enzim GOD yang terimobilisasi bentonit termodifikasi asam ini cukup stabil apabila dibandingkan dengan metode adsorpsi karena berdasarkan penelitian.

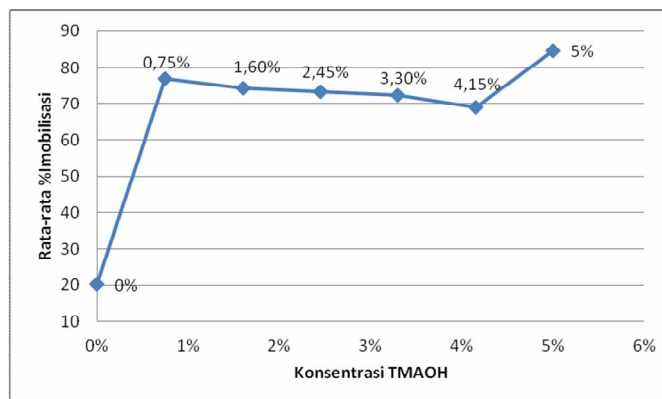
F.2. Imobilisasi Enzim GOD Pada Bentonit Termodifikasi Surfaktan (TMA-OH)

Imobilisasi enzim GOD pada bentonit termodifikasi surfaktan dengan variasi konsentrasi 0,75% hingga 5% dilakukan dengan konsentrasi enzim awal tertentu. Penentuan konsentrasi enzim awal dan enzim tidak terimobilisasi dilakukan menggunakan metode Hartree Lowry.

Selain itu, dilakukan juga imobilisasi enzim GOD pada bentonit yang tidak dimodifikasi untuk melihat kemampuan imobilisasi bentonit sebelum dimodifikasi. Hasil imobilisasi enzim GOD pada bentonit tidak termodifikasi (TMAOH 0%) dan hasil imobilisasi enzim GOD pada bentonit termodifikasi (TMAOH 0,75% - 5%) dapat dilihat pada tabel 7 dan gambar 3.

Tabel 7. Persentase Imobilisasi Enzim GOD

[TMAOH]	[Enzim] Awal (IU/ml)			[Enzim] Terimobilisasi (IU/ml)			% imobilisasi		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0%	10,138	10,138	10,138	1,282	2,106	2,747	12,65	20,78	27,10
0,75%	17,922	17,922	10,138	13,645	13,828	7,875	76,13	77,16	77,68
1,60%	17,922	17,922	10,138	12,546	13,187	8,059	70,00	73,58	79,49
2,45%	17,922	17,922	10,138	12,363	13,462	7,692	68,98	75,11	75,87
3,30%	17,922	16,365	10,138	13,095	11,722	7,326	73,07	71,62	72,26
4,15%	17,922	16,365	10,138	13,462	10,165	7,051	75,11	62,11	69,55
5%	17,922	16,365	10,138	14,835	13,553	8,974	82,78	82,82	88,52



Gambar 3. Grafik Pengaruh Konsentrasi Surfaktan Terhadap %Imobilisasi

Dari tabel 7 dan gambar 3, terlihat bahwa persentase imobilisasi semakin menurun dengan penambahan konsentrasi TMAOH dari 0,75% - 4,15%. Namun, pada konsentrasi TMAOH 5%, terjadi kenaikan persentase enzim terimobilisasi yang cukup tinggi. Penurunan persentase enzim yang terimobilisasi dari 0,75% hingga 4,15% kemungkinan disebabkan oleh belum terbentuknya pilar TMA yang stabil untuk menahan lapisan-lapisan pada bentonit untuk membentuk pori interlayer berukuran meso sebagai tempat teradsorbsinya enzim GOD. Pilar-pilar yang belum stabil tersebut mudah runtuh dengan adanya perlakuan tertentu, misalnya pemanasan pada suhu 100°C pada tahap pengeringan bentonit termodifikasi. Dengan tidak terbentuknya pilar TMA yang stabil dan pori interlayer berukuran meso, penambahan konsentrasi TMAOH hanya akan memenuhi pori yang terbentuk dengan molekul-molekul TMAOH, sehingga memperkecil ruang dalam bentonit untuk tempat masuknya enzim GOD. Oleh karena itu, pada bentonit termodifikasi 4,15% TMAOH terjadi persentase imobilisasi yang paling rendah. Namun, pada bentonit termodifikasi 5% TMAOH terjadi kenaikan yang

cukup tinggi pada persentase imobilisasi. Hal ini mungkin disebabkan oleh sudah terbentuknya pilar yang stabil menghasilkan pori interlayer berukuran meso sebagai tempat teradsorbsinya enzim GOD. Dari hasil tersebut dipilih konsentrasi surfaktan TMAOH 5% adalah konsentrasi surfaktan yang paling baik karena mampu memberikan perbedaan yang signifikan dengan 3 konsentrasi surfaktan lainnya. Enzim GOD terimobilisasi pada TMAOH 5% akan dikarakterisasi suhu, pH, nilai K_m dan V_{max} -nya, serta ditentukan berapa kali jumlah pemakaiannya hingga mencapai penurunan aktivitas 50%.

F.2.1 Penentuan Suhu Terbaik

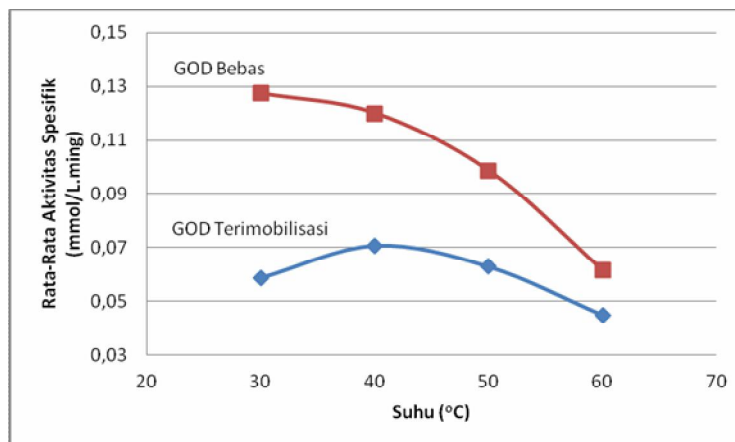
Penentuan suhu terbaik dilakukan dengan uji aktivitas, dimana dilakukan pengukuran terhadap produk (H_2O_2) yang dihasilkan. Produk (H_2O_2) yang dihasilkan diketahui dari absorbansi hasil reaksi pada panjang gelombang 525nm, dan dimasukkan ke persamaan regresi linier kurva standard uji aktivitas. Pada persamaan reaksinya, jumlah mol H_2O_2 yang dihasilkan setara dengan jumlah mol glukosa yang dikonversi, sehingga dapat dikatakan bahwa konsentrasi produk (mmol/L) yang dihasilkan sama dengan konsentrasi glukosa (mmol/L) yang dikonversi oleh enzim GOD terimobilisasi. Enzim terimobilisasi yang digunakan untuk tahap ini adalah enzim terimobilisasi dari hasil imobilisasi replikasi ke-2 yang telah dicuci sebanyak 4x, menghasilkan enzim terimobilisasi sebanyak 13,553 IU/ml atau setara dengan 0,05274 mg enzim. Karena protein yang terdapat dalam campuran reaksi hanyalah enzim, maka massa enzim sama dengan massa protein.

Tabel 8 Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas GOD Terimobilisasi dan GOD bebas

Replikasi	Konsentrasi glukosa yang dikonversi (mmol/L)							
	30 °C		40 °C		50 °C		60 °C	
	i	b	i	b	i	b	i	b
1	0,172	0,444	0,214	0,409	0,179	0,342	0,125	0,211
2	0,189	0,469	0,239	0,455	0,225	0,352	0,157	0,228
3	0,196	0,448	0,218	0,420	0,193	0,359	0,143	0,218
Rata-Rata	0,186	0,454	0,224	0,428	0,199	0,351	0,142	0,219
Aktivitas (mmol/L.min)	$3,10 \cdot 10^{-3}$	$7,57 \cdot 10^{-3}$	$3,73 \cdot 10^{-3}$	$7,13 \cdot 10^{-3}$	$3,31 \cdot 10^{-3}$	$5,85 \cdot 10^{-3}$	$2,37 \cdot 10^{-3}$	$3,65 \cdot 10^{-3}$
Aktivitas Spesifik (mmol/L.min.mg)	$5,87 \cdot 10^{-2}$	0,127	$7,07 \cdot 10^{-2}$	0,120	$6,28 \cdot 10^{-3}$	$9,85 \cdot 10^{-2}$	$4,49 \cdot 10^{-3}$	$6,14 \cdot 10^{-2}$

Ket: i = GOD terimobil; b = GOD bebas

Dari tabel 8 dan gambar 4, terlihat bahwa titik puncak konsentrasi glukosa yang dioksidasi oleh enzim GOD terimobilisasi berada pada suhu 40°C, dan mengalami penurunan di kedua sisinya, yaitu pada suhu 30°C, dan suhu 50°C dengan aktivitas terendah pada suhu 60 °C. Hal ini menunjukkan suhu terbaik untuk aktivitas enzim GOD terimobilisasi pada bentonit termodifikasi TMAOH 5% adalah pada suhu 40-50 °C. Enzim memiliki aktivitas katalitik yang luar biasa dan bergantung kepada integritas strukturnya sebagai protein. Struktur kerangka primer protein enzim dibutuhkan untuk aktivitas enzim. Pelipatan rangkai protein yang khas dari suatu protein enzim utuh oleh panas, perlakuan pH yang jauh menyimpang dari keadaan normal atau oleh senyawa perusak lainnya mengakibatkan aktivitas katalitik enzim akan lenyap.



Gambar 4. Grafik Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Spesifik Enzim GOD

Perbedaan signifikan terhadap aktivitas enzim GOD pada suhu 60 °C kemungkinan terjadi akibat suhu yang sudah terlalu panas sehingga menyebabkan enzim terdenaturasi dan menghasilkan aktivitas yang rendah. Denaturasi protein adalah suatu keadaan telah terjadinya perubahan struktur protein yang mencakup perubahan bentuk dan lipatan molekul, tanpa menyebabkan pemutusan atau kerusakan lipatan antar asam amino dan struktur primer protein.

Apabila dibandingkan kondisi suhu terbaik antara enzim GOD terimobilisasi dan enzim GOD bebas, terjadi pergeseran *range* suhu terbaik dari 30-40°C untuk enzim bebas menjadi 40-50°C untuk enzim terimobilisasi. Hal ini menunjukkan bahwa imobilisasi mempengaruhi suhu yang diperlukan oleh enzim untuk bekerja dengan baik. Pengaruh ini kemungkinan disebabkan oleh enzim GOD yang berada di dalam pori interlayer bentonit, sehingga enzim berada dalam suatu *micro-environment* yang menyebabkannya lebih tahan terhadap panas karena terlindungi oleh matriks pengimobilnya, yaitu bentonit.

Fenomena lain yang terlihat adalah adanya penurunan aktivitas enzim GOD terimobilisasi hingga $\pm 50\%$ bila dibandingkan dengan aktivitas enzim GOD bebas. Perbedaan aktivitas hingga $\pm 50\%$ ini kemungkinan disebabkan oleh rendahnya interaksi substrat dengan enzim akibat terhalang oleh matriks pengimobil.

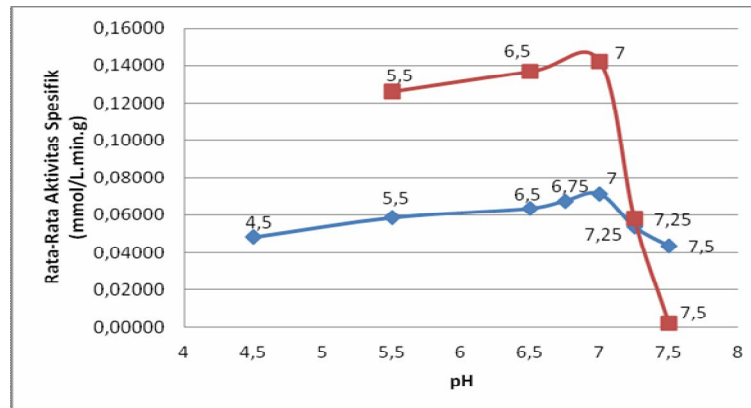
F.2.2. Penentuan pH Terbaik

Enzim terimobilisasi yang digunakan untuk tahap ini adalah enzim terimobilisasi dari hasil imobilisasi replikasi ke-2 yang telah dicuci sebanyak 5x, menghasilkan enzim terimobilisasi sebanyak 11,107 IU/ml atau setara dengan 0,04322 mg enzim. Selain itu, dilakukan pula penentuan pH terbaik untuk enzim GOD bebas, dengan cara uji aktivitas yang sama dengan penentuan pH terbaik untuk enzim GOD terimobilisasi. Namun, untuk penentuan pH terbaik enzim bebas ini, hanya dilakukan pada pH 5,5; 6,5; 7; 7,25; dan 7,5.

Dari tabel 9 dan gambar 5 terlihat bahwa dengan kenaikan pH dari pH 4,5 hingga pH 7 terjadi kenaikan aktivitas spesifik enzim GOD terimobilisasi. Setelah pH 7, yaitu pada pH 7,25 – 7,5 terjadi penurunan konsentrasi glukosa yang dioksidasi oleh enzim GOD. Aktivitas spesifik rata-rata yang paling tinggi untuk penentuan pH terbaik enzim bebas adalah pada pH 7. Dapat dikatakan bahwa pH 7 merupakan kondisi yang terbaik untuk aktivitas enzim GOD terimobilisasi pada bentonit termodifikasi TMAOH 5%.

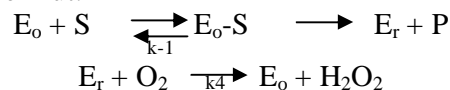
Tabel 9. Pengaruh pH Terhadap GOD Terimobilisasi dan GOD bebas

Aktivitas Spesifik (mmol/L.min.mg)	pH						
	4,5	5,5	6,5	6,75	7	7,25	7,5
GOD Terimobilisasi	$4,84.10^{-2}$	$5,84.10^{-2}$	$6,34.10^{-2}$	$6,75.10^{-2}$	$7,12.10^{-2}$	$5,39.10^{-2}$	$4,38.10^{-2}$
GOD bebas	n/a	0,118	0,148	n/a	0,142	$5,51.10^{-2}$	$2,19.10^{-3}$



Gambar 5. Grafik Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Spesifik Enzim GOD

Fenomena lain yang menarik adalah perbedaan signifikan yang terjadi antara aktivitas enzim GOD terimobilisasi pada pH 7 dengan pH 7,25. Persamaan kinetika enzim GOD adalah sebagai berikut:



Persamaan di atas menunjukkan enzim GOD awalnya terdapat dalam bentuk teroksidasi (E_o) yang akan berinteraksi dengan substrat dan akan membentuk produk dan enzim tereduksi (E_r). Reoksidasi yang cepat dari enzim GOD tereduksi (E_r) oleh O_2 untuk meregenerasi enzim GOD teroksidasi (E_o) merupakan reaksi yang mendominasi pada pH kurang dari 7. Pada pH lebih dari 7, reaksi yang terjadi antara enzim GOD tereduksi dengan oksigen menjadi sangat lambat, dan mengarah pada pembentukan E_o^- . E_o^- tidak reaktif dengan glukosa dan konversi dari bentuk terprotonasi dari E_o^- menjadi E_o yang pada pokoknya mengatur k_{cat} pada nilai pH lebih dari 7 (Weibel dan Bright, 1971). Oleh karena itu, terlihat perbedaan signifikan aktivitas enzim GOD pada pH 7 dan pH 7,25.

Apabila dibandingkan kondisi pH terbaik antara enzim GOD terimobilisasi dan enzim GOD bebas, tidak terjadi pergeseran *range* pH terbaik. Hal ini menunjukkan bahwa imobilisasi tidak mempengaruhi pH yang diperlukan oleh enzim untuk bekerja dengan baik karena tidak terjadi pergeseran *range* pH terbaik dari enzim GOD bebas.

F.2.3 Penentuan nilai K_m dan V_{max}

Penentuan nilai K_m dan V_{max} dilakukan dengan uji aktivitas enzim terimobilisasi menggunakan konsentrasi glukosa yang bervariasi, yaitu 1% hingga 15% (b/v). Konsentrasi enzim yang digunakan untuk GOD terimobilisasi adalah 11,107 IU/ml sedangkan untuk GOD bebas adalah 10,138 IU/ml atau setara dengan 0,03945 mg enzim. Kecepatan reaksi ditentukan dari konsentrasi H_2O_2 yang terbentuk dibagi waktu reaksi.

Tabel 10. Penentuan nilai K_m dan V_{max} Enzim GOD Terimobilisasi dan GOD bebas

%glukosa	[S](ppm)	1/[S]	Konsentrasi H_2O_2 dihasilkan (ppm)		V (ppm/min)		1/V	
			i	b	i	b	i	b
1%	5000	$2,00 \cdot 10^{-4}$	5,47182	7,039	0,091	0,117	10,965	8,524
2%	10000	$1,00 \cdot 10^{-4}$	6,87794	8,847	0,115	0,147	8,724	6,782
3%	15000	$6,67 \cdot 10^{-5}$	7,68144	9,730	0,128	0,162	7,811	6,166
6%	30000	$3,33 \cdot 10^{-5}$	8,84651	10,775	0,147	0,180	6,782	5,569
9%	45000	$2,22 \cdot 10^{-5}$	9,20808	11,458	0,153	0,191	6,516	5,237
12%	60000	$1,67 \cdot 10^{-5}$	9,77053	12,261	0,163	0,204	6,141	4,893
15%	75000	$1,33 \cdot 10^{-5}$	9,81071	12,864	0,164	0,214	6,116	4,664

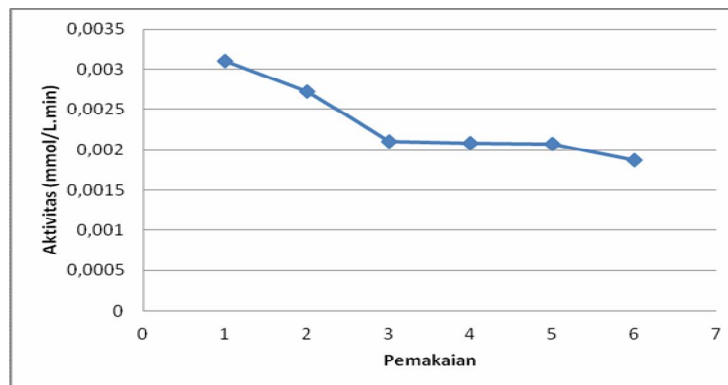
Ket: i = GOD terimobil; b = GOD bebas

Dengan rumus regresi, untuk GOD terimobilisasi diperoleh $y = 26142x + 5,8904$, sehingga nilai $V_{max} = 0,169768$ ppm/min, dan nilai $K_m = 4438,069$ ppm. Sedangkan untuk enzim GOD bebas diperoleh $y = 19685x + 4,7048$, maka nilai $V_{max} = 0,212549$ ppm/min, dan nilai $K_m = 4184,025$ ppm. Apabila dibandingkan antara enzim GOD bebas dengan enzim GOD terimobilisasi, terlihat bahwa dengan konsentrasi enzim yang hampir sama, nilai K_m dari enzim GOD terimobilisasi lebih besar dibandingkan dengan nilai K_m dari enzim GOD bebas. Sedangkan, nilai V_{max} enzim GOD bebas lebih besar dibandingkan dengan nilai V_{max} enzim GOD terimobilisasi. Hal ini menunjukkan imobilisasi enzim mempengaruhi nilai K_m dan V_{max} . Pengaruh ini kemungkinan disebabkan oleh adanya matriks pengimobil berupa bentonit sehingga enzim GOD terimobilisasi pergerakannya lebih terbatas dibandingkan dengan enzim bebas dan mengakibatkan kontakannya dengan substrat lebih kecil sehingga V_{max} -nya pun lebih kecil dan konsentrasi glukosa yang diperlukan untuk mencapai setengah V_{max} lebih besar.

F.2.4. Penentuan Jumlah Pemakaian Maksimum (cycle) GOD Terimobilisasi Pada Bentonit Termodifikasi Surfaktan

Penentuan jumlah pemakaian maksimum enzim GOD terimobilisasi dilakukan dengan menggunakan 10 μ l enzim terimobilisasi untuk diuji aktivitasnya berulang kali hingga diperoleh penurunan aktivitas hingga 50%.

$$\% \text{penurunan aktivitas} = \frac{(\text{aktivitas pertama} - \text{aktivitas pemakaian ke } n) \times 100\%}{\text{aktivitas pertama}}$$



Gambar 6 Grafik Jumlah Pemakaian GOD Terimobilisasi

Dari Gambar 6 terlihat bahwa penurunan aktivitas banyak terjadi dari pemakaian pertama hingga ketiga. Hal ini mungkin terjadi karena enzim diimobilisasi dengan sistem adsorpsi sehingga enzim tidak terikat cukup kuat pada bentonit dan enzim yang terdapat di bagian permukaan sebelah luar mudah terlepas saat diberi perlakuan tertentu. Sedangkan setelah pemakaian ketiga, enzim yang tersisa pada bentonit sudah cukup stabil terjebak dalam pori-pori bentonit sehingga *leaching* hanya terjadi dalam jumlah yang kecil.

G. KESIMPULAN

1. Bentonit termodifikasi HCl dan surfaktan TMA-OH dapat digunakan sebagai matriks pengimobilisasi enzim GOD. Modifikasi terbaik ditunjukkan pada hasil imobilisasi tertinggi. Hasil terbaik ditunjukkan pada modifikasi dengan HCl 1 M hingga 2 M dan TMAOH 5% (v/v).
2. Suhu terbaik enzim GOD terimobilisasi bentonit termodifikasi HCl adalah $30 \pm 2^\circ\text{C}$ dan 40°C , dan pH terbaik sebesar 5,5-7. sedangkan untuk GOD terimobilisasi pada bentonit termodifikasi TMAOH 5% adalah pada suhu $40-50^\circ\text{C}$, dan pH 7.
3. Proses imobilisasi berpengaruh pada nilai K_m dan V_{max} dari enzim GOD. Nilai V_{max} dari enzim terimobilisasi bentonit-asam sebesar 0,183 ppm/min dan nilai K_m 8609,12 ppm. Sedangkan enzim terimobilisasi surfaktan, V_{max} adalah 0,169768 ppm/menit, dan (K_m) adalah 4438,069 ppm.
4. Enzim GOD terimobilisasi bentonit termodifikasi HCl memiliki kestabilan yang cukup tinggi karena dapat digunakan sebanyak 7 kali pemakaian dengan penurunan aktivitas spesifik sebesar $\pm 30\%$, sedangkan GOD terimobilisasi pada bentonit termodifikasi TMAOH 5% dapat digunakan sebanyak 6x hingga aktivitasnya menurun sebanyak 39,44%.

LAMPIRAN

Daftar Pustaka

1. Ad'anyi N, T'oth-Markus M, Szab'ó EE, V'aradi M, Sammartino MP, Tomassetti M and Campanella L, Investigation of organic phase biosensor for measuring glucose in flow injection analysis system. *Analytica Chimica Acta* 501:219–225 (2004).
2. Arief B., 2002, **Metode Pillarisasi dan Interkalasi Lempung**, Jurnal Teknologi Industri dan Informasi, vol. 3, No. 1, UBAYA, Surabaya, 35-42.
3. Atia, K.S. and Al El-Batal, Preparation of glucose oxidase immobilized in different carriers using radiation Polymerization, *J Chem Technol Biotechnol* 80:805–811 (2005)
4. Arief B., 2004, **Pillarization of Natural Bentonite Clay Using Al and Fe Through CMC (Carboxyl Methyl Cellulose) Intercalation**, Prosiding Seminar Nasional Kimia, Universitas Gadjah Mada, ISSN : 1410-8313, Oktober 2004.
5. Arief B., Hadiatni Rita, P., Yanti dan Dina Kartika, 2003, **Pillarisasi bentonite Clay dan Aplikasinya dalam Penghilangan Warna pada Limbah Industri Tekstil**, Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia Indonesia 2003 di Yogyakarta, ISBN : 979-97893-0-3, KR-17.
6. Arief Budhyantoro, Restu Kartiko Widi, Emma Savitri, **Pillarisation of Natural Bentonite with Mixed Metal Fe-Al And Its Application in Chromium Ion Adsorption**, 12th Asian Chemical Congress, Federation of Asian Chemical Societies, Kuala Lumpur, Malaysia (accepted, February 2007)

7. Bonczek, J.L., Harris, W.G. and Kizza P.Nk., 2002, **Monolayer to Bilayer Transitional Arrangements of Hexadecyltrimethylammonium Cations on Na-Montmorillonite**, *Clays and Clay Minerals*, vol. 50, No. 1, 11-17.
8. Chibata, I., "Immobilized Enzymes. Research and Development", Wiley, New York, 1978.
9. Cirpan, A., S. Alkan, L. Toppare, Y. Hepuzer, Y. Yagci, *Bioelectrochemistry* 59 (2003) 29.
10. Cool, P. and Vansant, E.F., 1998, **Pillare Clays: Preparation, Characterization and Applications**, *Accademic Press*, Antwerp, Belgia.
11. Clearfield, A., 1998, **Organikally Pillared Micro-and Mesoporous Materials**, *Chem.Mater*, Vol.10, 2801-2810.
12. Davis, R.D., Gilman, J.W., Sutto, T.E., Callahan, J.H., Trulove, P.C. And De Long, H.C., 2004, **Improved Thermal Stability Of Organikally Modified Layered Silicates**, *Clays and Clay Minerals*, Vol. 52, No. 2, 171-179.
13. Deng, Y., Dixon, J.B. And G. White, G. N., 2004, **Intercalation And Surface Modification Of Smectite By Two Non-Ionic Surfactants**, *Clays And Clay Minerals*, Vol. 51, No. 2, 150-161.
14. Elena A. Markvicheva, Vladimir I. Lozinsky, Fatima M. Plieva, Konstantin A. Kochetkov, Lev D. Rumsh, Vitali P. Zubov, Jyotirmoy Maity, Rajesh Kumar, Virinder S. Parmar, and Yuri N. Belokon, Gel-immobilized enzymes as promising biocatalysts: *Pure Appl. Chem.*, Vol. 77, No. 1, pp. 227-236, 2005.
15. He, H., Frost, R.L., Deng, F., Zhu, J., Wen, X. And Yuan, P., 2004, **Conformation Of Surfactant Molecules In The Interlayer Of Montmorillonite Studied By ¹³C Mas NMR**, *Clays And Clay Minerals*, Vol. 52, No. 3, 350-356,
14. Huston, N.D., Donald, J., Gualdoni and Yang, R.T., 1998, **Synthesis and Characterization of The Microporosity of Ion-Exchanged Al₂O₃-Pillared Clays**, *Chem. Mater*, Vol.10, American Chemical Society Publiser, USA, 3707-3715.
15. <http://www.tekmira.esdm.go.id>, diakses pada April 2007
16. Imai, Y., Nishimura, S., Inukai, Y. And Tateyama, H., 2003, **Differences In Quasicrystals of Smectite-Cationic Surfactant Complexes Due To Head Group Structure**, *Clays And Clay Minerals*, Vol. 51, No. 2, 162-167.
17. Isik, S., S. Alkan, L. Toppare, I. Cianga, Y. Yagci, *Eur. Polym. J.* 39 (2003) 2375.
18. Iwuoha EI and Smyth MR, Reactivity of a glucose oxidase electrode in a polar organic solvent. *Anal Proc Incl AnalCommun* 31:19-21 (1994).
19. J, Ferris, 2000, **Clay-Catalyzed Polymerization Activity**, *Artikel of Astrobiology, New York Centre for Student the Origin of Live*, USA.
20. Kaks A and Klivanov AM, Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. *J Biol Chem* 263:3194-3201 (1988).
21. Khaorapapong, N., Kuroda, K. and Ogawa, M., 2002, **Intercalation of 8-Hydroxyquinoline into Al-Smectites by Solid-solid Reaction**, *Clays and Clay Minerals*, Vol. 50, NO. 4, 428-434.
22. Long, R.Q., and Yang, R.T., 1999, **Selective Catalytic Reduction of Nitrogen Oxides by Ammonia over Fe³⁺-Exchanged TiO₂-Pillared Clay Catalyst**, *Journal of Catalysis*, Vol.186, 252-268.
23. Laane C, Boeren S, Vos Kand Veeger C, Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents, *Biotechnol Bioeng* 30:81-87 (1987).
24. Larreta-Garde V, Xu ZF, Biton J and Thomas D, Stability of enzymes in low water activity media, in *Biocatalysis in OrganicMedia*, ed by Laane C, Tramper J and Lilly MD. Elsevier, Amsterdam, pp 137-146 (1987).
25. Mozhaev VV, Khmelnitsky YL, Sergeeva MV, Belova AB, Klyachko NL, Levashov AV and Martinek K, Catalytic activity and denaturation of enzymes in water/organic cosolvent mixtures: α -chymotrypsin and laccase in mixed water/alcohol, water/glycol and water/formamide solvents. *Eur J Biochem* 184:597-602 (1989).
26. Pinnavaia, T.J., (1983), **Intercalated Clays Catalysts**, *Science* Vol.220, No.4595, Michigan, pp: 365-371.
27. Polverejan, M., Pauly, R.T., and Pinnavaia, T., 2000, **Acidic porous Clay Heerostructures (PCH) : Intragallery Assembly of Mesoporous Silica in Synthetic Saponite Clays**, *Chem.Mater.*, Vol.12, 2698-2704.
28. Polverejan, M., Liu, Y., and Pinnavia T., 2002, **Aluminated Derivatives of Porous Clay Heterostructures (PCH) Assembled from Synthetic Saponite Clay: Properties as Supermicroporous to Small Mesoporous Acid Catalysts**, *Chem.Mater.*, Vol.14, 2283-2288.
29. Raba, J., Mottola, H.A. 1995. **Glucose Oxidase as an Analytical Reagent**. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* Vol 25(1):1-42

30. Reslow M, Adlercreutz P and Mattiasson B, Organic solvents for bioorganic synthesis 1. Optimization of parameters for a chymotrypsin catalyzed process. *Appl Microbiol Biotechnol* 26:1-8 (1987).
31. Restu Kartiko Widi, Arief Budhyantoro, **Effect of HDTMA on Pillarisation of Bentonite with Metal Fe And Its Application in Copper Ion Adsorption**, 12th Asian Chemical Congress, Federation of Asian Chemical Societies Kuala Lumpur, Malaysia (accepted, February 2007)
32. Sanjay, G., S. Sugunan, Invertase immobilised on montmorillonite: reusability enhancement and reduction in leaching, *Catalysis Communications* 6 (2005) 81-86
33. Sarath Babu VR, Kumarb MA, Karanth NG and Thakur MS, Stabilization of immobilized glucose oxidase against thermal inactivation by silanization for biosensor applications, *Biosensors and Bioelectronics* 19:1337-1341(2004).
34. Sarikaya, Y., Önal M., Baran, B. and Alemdaroğlu, T., 2000, **The Effect of Treatment on Some The Physicochemical Properties of a Bentonite**, *Clays and Clay Minerals*, Vol. 48, No. 5, 557-562.
35. Shpeizer, B.G., Sylvestre, P., Cahill, R.A. and Clearfield, A., 1999, **Nickel Oxide Interstratified and Pillared α -Zirconium Phosphate**, *Chem. Mater*, Vol. 11, American Chemical Society, 1201 - 1209.
36. Slade, P.G., And Gates, W.P., 2004, **The Ordering of HDTMA In The Interlayers Of Vermiculite And The Influence of Solvents**, *Clays And Clay Minerals*, Vol. 52, No. 2, 204-210.
37. Trevan, M.D., "Immobilized Enzymes. An Introduction and Applications in Biotechnology", Wiley, New York, 1980.
38. Tsuge H, Natsuakai O and Ohashi K, Purification, properties and molecular features of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *J Biochem* 78:835-843 (1975).
39. US Patent no. 5610113 (1997), Patent Storm, issued on March 11, 1997
40. US Patent no. 6495511 (2001), Patent Storm, issued on December 17, 2001
41. Vasant R. Choudary, Suman K. Jana, Nilesh S. Patil, 2001, *Catal. Lett.* Vol. 76, no. 3-4, pp. 235-239
42. Vasileva N and Godjevargova Ts, Study of the effect of some organic solvents on the activity and stability of glucose oxidase. *Materials Science and Engineering* C25:17-21 (2005).
43. Vasilios, G., Dimitrios, G. and Dimitrios, P., 2001, **Organo-Clay Derivatives in the Synthesis of Macrocycles**, *WILEY-VCH Verlag GmbH*, Weinheim, Nederland.
44. Weiss, Z.K., Š Kovač, M.V., Kr̃ I'Štkova', M., Č Apkova', P. And Pospiš Il, M., 2004, **Intercalation And Grafting Of Vermiculite With Octadecylamine Using Low-Temperature Melting**, *Clays And Clay Minerals*, Vol. 51, No. 5, 555-565.
45. Whitaker, J.R., A.G.J. Voragen, D.W.S Wong. 2003. **Handbook of Food Enzymology**. Marcel Dekker, Inc. New York
46. Worsfold P. J ., Iupac Classification And Chemical Characteristics Of Immobilized Enzymes, *Pure & Appl. Chem.*, Vol. 67, No. 4, pp. 597-600, 1995.
47. Zhu, H.Y., Vansant, E.F. and Max Lu, G.Q., 1999, **Development of Composite Adsorbents of Carbon and Intercalated Clay for N₂ and O₂ Adsorption: A Preliminary Study**, *Jour. Of Colloid and Interface Science*, Vol.210, 352-359.
48. Zhu, H.Y. and Max Lu, G.Q., 2001, **Engineering The Structure of Nanoporous Clays with Micelles of Alkyl Polyether Surfactants**, *Langmuir*, 17, 588-594.

